

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) **公開特許公報 (A)**

(11)特許出願公開番号

**特開平9-313178**

(43)公開日 平成9年(1997)12月9日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
C 12 N 9/96  
9/04

識別記号 庁内整理番号  
9/04

F I  
C 12 N 9/96  
9/04

技術表示箇所  
A

審査請求 未請求 請求項の数4 FD (全4頁)

(21)出願番号 特願平8-158893

(22)出願日 平成8年(1996)5月29日

(71)出願人 000170565  
国際試薬株式会社  
兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号  
(72)発明者 岸 浩司  
神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内  
(72)発明者 白波瀬 泰史  
神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内  
(72)発明者 渡津 吉史  
神戸市西区室谷1丁目1-2 国際試薬株式会社研究開発センター内  
(74)代理人 弁理士 廣瀬 孝美

(54)【発明の名称】 酵素の安定化方法及び酵素組成物

(57)【要約】

【課題】 血中コレステロールなどの測定に使用されるコレステロール脱水素酵素の安定化方法及び当該酵素組成物を提供する。

【解決手段】 本発明のコレステロール脱水素酵素の安定化方法はコレステロール脱水素酵素に配糖体を添加することからなり、また本発明の酵素組成物はコレステロール脱水素酵素と配糖体を含有することからなる。本発明によれば、配糖体の作用によりコレステロール脱水素酵素の安定性を著しく高めることができ、特に液状においても顕著な安定化効果を奏するという特長を有する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 コレステロール脱水素酵素に配糖体を添加することを特徴とするコレステロール脱水素酵素の安定化方法。

【請求項2】 コール酸及び／又はその誘導体を添加する請求項1記載のコレステロール脱水素酵素の安定化方法。

【請求項3】 コレステロール脱水素酵素と配糖体を含有することを特徴とするコレステロール脱水素酵素組成物。

【請求項4】 組成物が液状である請求項3記載のコレステロール脱水素酵素組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はコレステロール脱水素酵素の安定化方法及びコレステロール脱水素酵素組成物に関する。さらに詳しくは、主として臨床検査の分野での使用を目的とし、コレステロール脱水素酵素を安定化する方法及び安定なコレステロール脱水素酵素組成物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、酵素を用いた測定方法は、反応の特異性、再現性に優れ、操作が簡便であることなどから多数開発されてきた。特に臨床検査の分野では血液試料中の成分の測定に多くの方法が知られている。しかし、一般に、酵素は試薬にしたとき安定性が悪いため種々の工夫が必要となっていた。例えば、酵素 $\alpha$ -グルコシダーゼの安定化のために蛋白を修飾したり、有機溶媒としてグリセリンをLDHに添加し、またアセトンをベンジルアルコール脱水素酵素に添加して安定化することなどが報告されている。また、ジチオスレイトールのようなSH保護剤でウレアーゼの安定化をはかったり、リバーゼはCaなどの金属イオンを添加して安定化することも知られている。しかし、これらの方では、酵素が異なると効果がないことが多く、酵素によって個々に安定化方法が検討されていた。特に近年、臨床検査の日常業務の効率化を図るため、使用する試薬を従来の凍結乾燥状から液状に変えることが多くなり、ますます試薬中の酵素を安定化することが重要になってきた。ところで臨床検査の分野では最近、脂質の検査が増え、特にコレステロールは成人病のリスクファクターとして注目されており、コレステロールの検査がその分画成分の検査も含めて多くなっている。このコレステロールの測定は現在、酵素を用いる方法が一般的であり、それにはコレステロールオキシダーゼを用いる可視部での比色測定法とともに、コレステロール脱水素酵素を用いる紫外部での吸光度測定法が知られている。前者の方法においては、酵素反応により生成した過酸化水素を、ペルオキシダーゼの存在下、発色基質と反応させてキノン系色素に導く工程が必要であり、操作が煩雑である。また、測定条件によ

っては試料中のビリルビン、アスコルビン酸などによって誤差を生じるという欠点がある。それに対して、後者の方法は、NAD(P)の存在下、コレステロールとコレステロール脱水素酵素との酵素反応により生成するNAD(P)Hの量を測定するもので、紫外部の吸光度の変化を測定するだけで行えるので簡便であり、且つ試料中の夾雑物の影響も少ないという利点を有する。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】上述のように、コレステロールの測定法としてはコレステロール脱水素酵素を用いる方法が好適であるが、この方法に使用されるコレステロール脱水素酵素は従来より溶液状態では不安定な酵素として知られている。コレステロール脱水素酵素含有溶液を安定化するには、アルブミンやコール酸又はその誘導体を添加することが行われているが、いずれも低温保存でわざかに効果があるものの、試薬としては十分な安定性は得られていない。また、クリスタリンを生理活性蛋白質の溶液に含有せしめることにより安定化させる報告もあるが(特開平7-236483号公報)、コレステロール脱水素酵素に適用すると白濁防止の効果は認められるものの、酵素の活性を維持するには問題があった。本発明は上記の問題を解消するもので、本発明はコレステロール脱水素酵素を安定化し、試薬として臨床検査の分野に有用に貢献することを目的とするものである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、配糖体がコレステロール脱水素酵素の安定化に寄与することを見い出し、さらに研究を重ねた結果、コレステロール脱水素酵素に配糖体を添加することにより本発明の目的が達成されることが分かり、本発明を完成した。すなわち、本発明の要旨は、

- ①コレステロール脱水素酵素に配糖体を添加することを特徴とするコレステロール脱水素酵素の安定化方法；
- ②コール酸及び／又はその誘導体を添加する上記①記載のコレステロール脱水素酵素の安定化方法；
- ③コレステロール脱水素酵素と配糖体を含有することを特徴とするコレステロール脱水素酵素組成物；
- ④組成物が液状である上記③記載のコレステロール脱水素酵素組成物；である。

## 【0005】

【発明の実施の形態】本発明で安定化させるコレステロール脱水素酵素は、補酵素としてニコチンアミドアデニジヌクレオチド(NAD)依存性のものと、ニコチンアミドアデニジヌクレオチドリン酸(NADP)依存性のものがいずれも対象にできる。

【0006】本発明でコレステロール脱水素酵素に添加する配糖体には、本発明の目的に適合するものが全て使用できる。とりわけ糖部が、グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、シュークロース、マル

トースなどから選ばれるものがよい。また非糖部は疎水性の構造のものがよく、それには、高価を含むアルコール、脂肪酸、ステロイド、テルペノイドなどがある。このような配糖体として具体的には、例えば、n-ドデシル- $\beta$ -D-マルトシド、n-ヘプチル- $\beta$ -D-チオグルコシド、n-オクチル- $\beta$ -D-グルコシド、n-オクチル- $\beta$ -D-チオグルコシド、ジギトニン、シーカロースモノカブレート、シーカロースモノラウレート、2-エチル-ヘキシルグルコシド、n-オクタノイル-N-メチルグルカミド、n-メチルグルカミド、n-ノナノイル-N-メチルグルカミドおよびn-デカノイル-N-メチルグルカミドなどを挙げることができ、2種以上を併用してもよい。

【0007】本発明においては、コール酸及び/又はその誘導体を添加することにより、さらにコレステロール脱水素酵素の安定性を向上させることができる。このようなコール酸誘導体としては本発明の目的を達成できるものなら全て用いることができる。とりわけ、コール酸の塩類（例えば、ナトリウム塩など）、デオキコール酸又はその塩類（例えば、ナトリウム塩など）、3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルフォネート(CHAPS)、3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルフォネート(CHAPSO)、N,N-ビス(3-D-グルコンアミドプロピル)コールアミド(デオキシ-BIGCHAP)が好ましい。コール酸とその誘導体は併用することができる。

【0008】本発明における配糖体のコレステロール脱水素酵素の安定化作用は、コレステロール脱水素酵素の液状試薬において顕著な効果を奏するが、凍結乾燥試薬においても効果を発現し得る。液状試薬の場合、適当な緩衝液（ヘペス緩衝液など）に溶解したコレステロール脱水素酵素溶液に配糖体を添加することにより調製できる。また、凍結乾燥試薬の場合、コレステロール脱水素酵素溶液に配糖体を添加したのち常法に準じて凍結乾燥することにより調製できるが、凍結乾燥物に配糖体を添加してもよく、さらに凍結乾燥前の溶液及び凍結乾燥物の両方に配糖体を添加してもよい。

【0009】本発明でコレステロール脱水素酵素に添加する配糖体の添加量は、配糖体の種類、試薬中のコレステロール脱水素酵素含量、試薬の保存条件などに応じて適宜設定できる。液状試薬において、例えば、n-ドデシル- $\beta$ -D-マルトシドを使用する場合は0.01～5.0 mMが好ましく、より好ましいのは0.1～2.0 mMである。また、シーカロースモノラウレートを使用する場合は0.05～1.00 mMが好ましく、より好ましいのは0.5 mM～5.0 mMである。凍結乾燥試薬に\*

## ②補酵素液

トリスヒドロキシメチルアミノメタン	300 mmol/l
NAD	2 mmol/l

\*における配糖体の添加量は、上記の量に準じて設定することができる。コール酸及び/又はその誘導体の添加量としては、0.01～1.0%が好ましく、より好ましくは0.05～5%である。

【0010】本発明の方法及び組成物は、血中コレステロールの測定などに使用されるコレステロール脱水素酵素含有試薬の調製に有用であり、従来、コレステロール脱水素酵素は、緩衝液に溶解した場合は冷蔵条件で保存しても1ヶ月もすると残存活性が消失したが、本発明の方法で配糖体を添加することにより、残存活性を著しく高めることができる。その残存活性値は、添加する配糖体の種類により異なるが、あらかじめ残存活性値から予測した酵素量を試薬の分量にすることにより、試薬化ができる。

## 【0011】

【発明の効果】本発明によれば、コレステロール脱水素酵素を安定化することができ、試薬化が可能となり、とりわけ液状での試薬供給が可能となる。従って、従来、安定化ができなかつたため凍結乾燥状で製品にしていたのに比べ、液状試薬を供給できるので、使用性が著しく向上し、臨床検査の分野に貢献できる。

## 【0012】

【実施例】次に実施例を挙げるが、本発明はこれらに限定されるものではない。

### 実施例

コレステロール脱水素酵素1単位/m1を、5.0 mM、pH 7.0のN-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(HEPES)緩衝液に溶解する。それに配糖体として、n-ドデシル- $\beta$ -D-マルトシド、n-ヘプチル- $\beta$ -D-チオグルコシド、n-オクチル- $\beta$ -D-グルコシド、n-オクチル- $\beta$ -D-チオグルコシド、ジギトニン、シーカロースモノカブレート、シーカロースモノラウレート、2-エチル-ヘキシルグルコシドをそれぞれ1.0 mM加えて溶解し、サンプルとする。それぞれ冷蔵、25°Cに所定期間放置後、以下に示す方法によりコレステロール脱水素酵素の残存活性を求めた。その結果を表1に示す。表1に示されるように、配糖体を添加すると残存活性が高いことが分かる。

40 【0013】コレステロール脱水素酵素活性の測定方法

#### 1. 試薬

以下の組成の試薬を使用した。

#### ①基質液

コレステロール	0.1%
トリトンX-100	0.2%

## 2. 測定法

補酵素液1.0mlと基質液2.0mlを混和し25℃に恒温する。恒温した混液にサンプル50μlを加えてよく混和し、精製水を対照に340nmにおける1分間当たりの吸光度変化量を求める。サンプルに代えて生理的\*

\*食塩水を使用して試薬ブランクを求める。サンプル調製直後の酵素活性量を100%として保存後の残存酵素活性量を相対値で表した。

【0014】

【表1】

表1

配 糖 体	冷 藏 (%) (30日放置)	25℃ (%) (1時間放置)
n-ドデシル-β-D-マルトシド	82	83
n-ヘプチル-β-D-チオグルコシド	52	54
n-オクチル-β-D-グルコシド	59	74
n-オクチル-β-D-チオグルコシド	42	74
ジギトニン	90	100
シュークロースモノカブレート	61	75
シュークロースモノラウレート	74	90
2-エチル-ヘキシルグルコシド	50	71
無添加	0	48

## \* NOTICES \*

JPO and INPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

### [Detailed Description of the Invention]

#### [0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the stabilization method and cholesterol dehydrogenase constituent of cholesterol dehydrogenase. It is related with the method and the stable cholesterol dehydrogenase constituent which stabilize cholesterol dehydrogenase mainly for the purpose of use in the field of a clinical laboratory test in more detail.

#### [0002]

[Description of the Prior Art] Conventionally, the measuring method using an enzyme was excellent in the singularity of a reaction, and reproducibility, and have been developed from operation being simple etc.

[ many ] Many methods are especially known for the field of a clinical laboratory test by measurement of the ingredient in a blood sample. However, generally, when an enzyme was used as a reagent, since stability was bad, various devices were needed. For example, protein is embellished for stabilization of enzyme \*\*-glucosidase, glycerin is added to LDH as an organic solvent, and adding and stabilizing acetone to benzyl alcohol dehydrogenase etc. is reported. It is also known that will achieve stabilization of an urease with a SH protecting agent like dithiothreitol, or lipase will add and stabilize metal ions, such as Ca. However, in these methods, if enzymes differ, it is ineffective in many cases, and the stabilization method was separately examined by the enzyme. In order to attain the increase in efficiency of the routine work of a clinical laboratory test especially in recent years, the reagent to be used is changed more often liquefied from the conventional letter of freeze-drying, and it is becoming important to stabilize the enzyme in a reagent increasingly. By the way, in the field of the clinical laboratory test, the inspection of lipid increases, especially cholesterol attracts attention as a risk factor of an adult disease, and the inspection of cholesterol has increased recently also including the inspection of the fractionation ingredient. Measurement of this cholesterol has a common method of using an enzyme now, and the spectrophotometry in the ultraviolet region using cholesterol dehydrogenase is known by it with the colorimetric assay in the visible portion which uses cholesterol oxidase. In the former method, the process of making the hydrogen peroxide generated by the enzyme reaction reacting to a chromophoric substrate, and leading it to quinone system coloring matter under existence of peroxidase is required, and operation is complicated. There is a fault of producing an error with the bilirubin in a sample, ascorbic acid, etc. depending on a measuring condition. It is what

measures the quantity of NAD(P) H which the latter method generates by the enzyme reaction of cholesterol and cholesterol dehydrogenase under existence of NAD (P) to it, Since it can carry out only by measuring change of the absorbance of an ultraviolet region, it has the advantage that there is also little influence of the impurity in a sample, simple.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]As mentioned above, although the method of using cholesterol dehydrogenase as a measuring method of cholesterol is preferred, the cholesterol dehydrogenase used for this method is known for solution states as an unstable enzyme from before. In order to stabilize a cholesterol dehydrogenase content solution, adding albumin, cholic acid, or its derivative is performed, but although all are slightly effective by cold storage, stability sufficient as a reagent is not obtained. Although there was also a report stabilized by making the solution of bioactive protein contain KURISUTARIN (JP,7-236483,A), and the effect of the prevention from nebula was accepted when applied to cholesterol dehydrogenase, there was a problem in maintaining the activity of an enzyme. This invention solves the above-mentioned problem, this invention stabilizes cholesterol dehydrogenase, and it aims at contributing to the field of a clinical laboratory test useful as a reagent.

[0004]

[Means for Solving the Problem]By adding a glycoside to cholesterol dehydrogenase, it turned out that the purpose of this invention is attained, and this invention persons completed this invention, as a result of finding out that a glycoside contributes to stabilization of cholesterol dehydrogenase as a result of repeating research wholeheartedly, and repeating research further. Namely, stabilization method of cholesterol dehydrogenase, wherein a gist of this invention adds a glycoside to \*\* cholesterol dehydrogenase;

\*\* Stabilization method of cholesterol dehydrogenase given [ above-mentioned ] in \*\* which adds cholic acid and/or its derivative;

\*\* Cholesterol dehydrogenase constituent containing cholesterol dehydrogenase and a glycoside;

\*\* A constituent is given [ liquefied / above-mentioned ] in \*\* cholesterol dehydrogenase constituent;

[0005]

[Embodiment of the Invention]Each of things of a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) dependency and things of a nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADP) dependency is made as for the cholesterol dehydrogenase stabilized by this invention to an object as a coenzyme.

[0006]All the things that suit the purpose of this invention can use it for the glycoside added to cholesterol dehydrogenase by this invention. That as which a sugar part is chosen from glucose, fructose, mannose, galactose, a shook sirloin, malt sugar, etc. is especially good. The thing of aglycone of a hydrophobic structure is good and there are alcohol, fatty acid, steroid, terpenoid, etc. containing quantity value in it. As such a glycoside, specifically, for example n-dodecyl-beta-D-maltoside, n-heptyl-beta-D-thioglucoside, n-octyl-beta-D-glucoside, n-octyl-beta-D-thioglucoside, digitonin, shook sirloin mono- caprate, Shook sirloin mono- laurate, 2-ethyl-hexylglucoside, n-octanoyl-N-methyl glucamide, n-methyl glucamide, n-nonanoyl-N-methyl glucamide, n-decanoyl-N-methyl glucamide, etc. can be mentioned, and two or more sorts may be used together.

[0007]In this invention, the stability of cholesterol dehydrogenase can be further raised by adding cholic acid

and/or its derivative. All can be used if the purpose of this invention can be attained as such a call acid derivative. Especially The salts, DEOKI cholic acid (for example, sodium salt etc.), or salts of those of cholic acid. (Sodium salt [ for example, ]) 3-[(3-call amide propyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 3-[(3-call amide propyl) dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate (CHAPSO) and N,N-bis(3-D-guru KONAMIDO propyl)call amide (deoxy BIGCHAP) are preferred. Cholic acid and its derivative can be used together.

[0008]Although the stabilization effect of the cholesterol dehydrogenase of the glycoside in this invention does a prominent effect so in the liquid reagent of cholesterol dehydrogenase, also in a freeze-drying reagent, it may reveal an effect. In the case of a liquid reagent, it can prepare by adding a glycoside in the cholesterol dehydrogenase solution which dissolved in suitable buffer solution (HEPESU buffer solution etc.). In the case of a freeze-drying reagent, after adding a glycoside in a cholesterol dehydrogenase solution, it can prepare by freeze-drying according to a conventional method, but a glycoside may be added in a freeze-drying thing and a glycoside may be further added in both the solution before freeze-drying, and a freeze-drying thing.

[0009]The addition of the glycoside added to cholesterol dehydrogenase by this invention can be suitably set up according to the kind of glycoside, the cholesterol dehydrogenase content in a reagent, the preservation conditions of a reagent, etc. When using n-dodecyl-beta-D-maltoside, 0.01 - 50mM is preferred, and 0.1 - 20mM is [ in / a liquid reagent ] more preferred. When using shook sirloin mono- laurate, 0.05 - 100mM is preferred, and 0.5mM - 50mM are more preferred. The addition of the glycoside in a freeze-drying reagent can be set up according to the above-mentioned quantity. As an addition of cholic acid and/or its derivative, 0.01 to 10% is preferred and is 0.05 to 5% more preferably.

[0010]When the method and constituent of this invention were useful to preparation of the cholesterol dehydrogenase content reagent used for measurement of cholesterol in blood, etc., and it dissolved in buffer solution, even if it saved cholesterol dehydrogenase on refrigeration conditions conventionally, when it carried out also for one month, residual activity disappeared, but. By adding a glycoside by the method of this invention, residual activity can be improved remarkably. Although the residual activity value changes with kinds of glycoside to add, reagent-ization can be performed by making into the daily dose of a reagent the amount of enzymes beforehand predicted from the residual activity value.

[0011]

[Effect of the Invention]According to this invention, cholesterol dehydrogenase can be stabilized, reagent-ization is attained and the reagent supply by the shape of liquid is especially attained. Therefore, since stabilization was not completed conventionally and a liquid reagent can be supplied compared with having used the product by the letter of freeze-drying, usability improves remarkably and can contribute to the field of a clinical laboratory test.

[0012]

[Example]Next, although an example is given, this invention is not limited to these.

One unit/ml of example cholesterol dehydrogenase is dissolved in 50mM and the N-2-hydroxyethyl piperazine N'-2-ethane-sulfonic-acid (HEPES) buffer solution of pH 7.0. To it, as a glycoside n-dodecyl-beta-D-maltoside, n-heptyl-beta-D-thioglucoside, n-octyl-beta-D-glucoside, n-octyl-beta-D-thioglucoside, digitonin,

shook sirloin mono- caprate, shook sirloin mono- laurate, and 2-ethyl-hexylglucoside are 10-mM-added, respectively, and it dissolves, and is considered as a sample. The residual activity of cholesterol dehydrogenase was searched for by refrigeration and the method shown in 25 \*\* after prescribed period neglect and at the following, respectively. The result is shown in Table 1. As shown in Table 1, when a glycoside is added, it turns out that residual activity is high.

[0013]The reagent of the presentation below the measuring method 1. reagent of cholesterol dehydrogenase activity was used.

\*\* Substrate liquid cholesterol 0.1% triton X-100 0.2%\*\* coenzyme liquid Trishydroxymethylaminomethane 1.0 ml of 300 mmol/l NAD 2 mmol/l2. measuring method coenzyme liquid and 2.0 ml of substrate liquid are mixed, and constant temperature is carried out to 25 \*\*. Sample 50microl is added to the mixture which carried out constant temperature, and it mixes well, and while [ 1 minute ] being able to set purified water to contrast at 340 nm, the amount of absorbance variations of a per is calculated. It replaces with a sample and asks for a reagent blank using physiological sodium chloride solution. The amount of enzyme activity immediately after sample preparation was made into 100%, and the amount of residual enzyme activity after preservation was expressed with the relative value.

[0014]

[Table 1]

表1

配 糖 体	冷蔵 (%) (30日放置)	25℃ (%) (1時間放置)
n-ドデシル- $\beta$ -D-マルトシド	8.2	8.3
n-ヘプチル- $\beta$ -D-チオグルコシド	5.2	5.4
n-オクチル- $\beta$ -D-グルコシド	5.9	7.4
n-オクチル- $\beta$ -D-チオグルコシド	4.2	7.4
ジギトニン	9.0	100
シュークロースモノカプレート	6.1	7.5
シュークロースモノラウレート	7.4	9.0
2-エチル-ヘキシルグルコシド	5.0	7.1
無添加	0	4.8

[Translation done.]

PAT-NO: JP409313178A  
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 09313178 A  
TITLE: STABILIZATION OF ENZYME AND ENZYME COMPOSITION  
PUBN-DATE: December 9, 1997

INVENTOR-INFORMATION:

NAME  
KISHI, KOJI  
SHIRAHASE, YASUSHI  
TOTSU, YOSHIFUMI

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME INTERNATL REAGENTS CORP	COUNTRY N/A
---------------------------------	----------------

APPL-NO: JP08158893

APPL-DATE: May 29, 1996

INT-CL (IPC): C12N009/96, C12N009/04

ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To enable the extreme increasing of the stability of an enzyme and accordingly the preparation of a liquid stable agent from the enzyme by adding a glycoside to a cholesterol dehydrogenase and obtain an enzyme composition useful for clinical examination, etc., such as determining cholesterol in blood.

SOLUTION: This liquid-type enzyme composition is obtained by dissolving a cholesterol dehydrogenase in an N-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) buffer solution of 50mM and pH7.0 and adding n-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside, n-heptyl- $\beta$ -D-thioglycoside, n-octyl- $\beta$ -D-glycoside,

n-octyl-&beta;D- thioglycoside, digitonin, sucrose monocaprate, 2-ethylhexylglycoside, etc., or cholic acid and/or its derivative as a glycoside to the resultant enzyme solution. The enzyme composition, whose enzyme component is stabilized, can be used for determining cholesterol in blood, etc.

COPYRIGHT: (C)1997, JPO